



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 102 04 566 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

⑲ Aktenzeichen: 102 04 566.6
⑳ Anmeldetag: 4. 2. 2002
㉔ Offenlegungstag: 14. 8. 2003

DE 102 04 566 A 1

⑦① Anmelder:
Nanogen Recognomics GmbH, 60311 Frankfurt, DE

⑦④ Vertreter:
Ackermann, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
65719 Hofheim

⑦② Erfinder:
Muth, Jochen, Dr., 65929 Frankfurt, DE; Kappel,
Andreas, Dr., 61462 Königstein, DE; Behrendsdorf,
Heike, Dr., 65929 Frankfurt, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 198 53 398 C1
US 58 49 486 A

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsmusters von DNA

⑤⑦ Beschrieben wird ein Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsmusters in DNA-Sequenzen, wobei nicht methyliertes Cytosin der DNA-Sequenz mit einer Detektor-DNA-Sequenz hybridisiert wird, wobei die Hybride orts aufgelöst auf einer Oberfläche fixiert sind. Im Anschluss erfolgt die Detektion von Guanin/Uracil-Fehlpaarungen unter Verwendung von solchen Fehlpaarungen erkennenden Substanzen.

DE 102 04 566 A 1

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsmusters von DNA insbesondere unter Verwendung von elektronisch adressierbaren Biochips.
- 5 [0002] Die Methylierung von DNA spielt in der Natur eine wichtige Rolle. Insbesondere die Aktivität von Genen wird mit Hilfe der Methylierung von einzelnen Cytosinen in der DNA reguliert. Um die Aktivität und Regulation einzelner Gene besser beurteilen zu können, besteht ein großes Interesse an Verfahren, mit denen sich solche Methylierungen einfach nachweisen lassen. Aus diesem Grunde wurden inzwischen mehrere Methoden entwickelt, die zur Bestimmung der Methylierungsrate und des Methylierungsmusters in der DNA geeignet sind.
- 10 [0003] Eine Methode benutzt Restriktionsenzyme, die methylierte Schnittstellen nicht als Substrat erkennen können (z. B. beschrieben in Analysis of DNA methylation and DNase I sensitivity in gene-specific regions of chromatin; Ginder, Gordon; Methods Hematol. Bd. 20 1989 S. 111–123). Mit diesen Verfahren können allerdings nur Methylierungen aufgespürt werden, die an den Restriktionsschnittstellen auftreten.
- [0004] Darüber hinaus gibt es weitere Verfahren, bei denen mit Hilfe der PCR die Methylierung von DNA-Sequenzen ermittelt wird (MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation; Cindy A. Eads, Kathleen D. Danenberg, Kazuyuki Kawakami, et. al.; Nucleic Acids Research 2000 Vol. 28, No 8.). Bei diesem Verfahren muss allerdings für jede Methylierungsposition eine entsprechende Farbstoff markierte Probe synthetisiert werden, was technisch sehr aufwendig ist.
- 15 [0005] Neben den beschriebenen biotechnologischen Ansätzen kann auch durch die chemische Umsetzungen mit Chloroacetaldehyd die Methylierung von DNA quantitativ bestimmt werden. Der Nachweis der Methylierung erfolgt bei diesem Verfahren mit Hilfe eines Spektrometers im Bereich zwischen 300 und 400 nm. (Quantification of 5-Methylcytosine in DNA by the Chloroacetaldehyde Reaction; Biotechniques 27, 744–752 October 1999, Oakeley E. J, Schmitt F, Jost J. P.)
- 20 [0006] Bei einer alternativen Methode wird das Methylierungsmuster mit Hilfe von Bisulfit SSCP ermittelt, wobei nicht methyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird. Mit Hilfe eines DNA-Sequenzers kann dann die Sequenz der untersuchten DNA-Probe bestimmt werden (Quantitative DNA Methylation analysis by fluorescent polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism using an automated DNA sequencer; Hiromu Suzuki, Fumio Itoh, Minoru Toyota Tekefumi KiKuchi Electrophoresis 2000 21, 904–908).
- 25 [0007] Der Erfindung liegt folglich die Aufgabe zugrunde ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsmusters von DNA-Sequenzen bereitzustellen.
- 30 [0008] Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, dass folgende Verfahrensschritte umfasst:
- a) Chemische Umwandlung von in Ausgangs-DNA enthaltenem nicht methylierten Cytosin zu Uracil, wobei die Sequenz der Ausgangs-DNA bekannt ist,
 - 35 b) Hybridisierung von einzelsträngigen, nach Schritt a) behandelter DNA mit einzelsträngigen Detektor-DNA-Sequenzen, die komplementär zur Sequenz der Ausgang-DNA oder deren Teilsequenzen sind, wobei die Guaninbasen gegen Adeninbasen ausgetauscht sein können,
 - c) Fixierung von einzelsträngiger Detektor-DNA oder von einzelsträngigen nach Schritt a) behandelten DNA-Sequenzen vor oder während der Hybridisierung oder von Heteroduplexen aus Detektor-DNA und nach Schritt a) behandelte DNA nach oder während der Hybridisierung, wobei die Fixierung ortsauflöst auf einem Träger erfolgt,
 - 40 d) Inkubation mit einem Guanin/Uracil- oder Adenin/Methylcytosin-Fehlpaarungen erkennenden Substrat und Detektion der Substratbindungen.
- 45 [0009] Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff "Ausgangs-DNA", eine DNA oder ein DNA-Fragment mit bekannter Sequenz verstanden, dessen Methylierungsmuster bestimmt werden soll.
- [0010] Unter dem Begriff "Detektor-DNA" fallen DNA-Polynucleotide, die zu Teilsequenzen der Ausgangs-DNA-Sequenz komplementär sind, wobei bevorzugt alle Guaninbasen gegen Adeninbasen ausgetauscht sind.
- 50 [0011] Der Begriff der "ortsauflösen" Fixierung besagt, dass einer bestimmten Detektor-DNA-Sequenz ein definierter Ort auf einem Träger zugeordnet werden kann. Die Beladung des Trägers kann dabei passiv, z. B. unter Einsatz von Pipettiergeräten oder aktiv, über elektronische Adressierung erfolgen. Verfahren zur Herstellung solcher Träger sind dem Fachmann bekannt. Zur Herstellung elektronisch adressierbarer Trägeroberfläche sind entsprechende Verfahren z. B. in Radtkey et al., Nucl. Acids Res. 28, 2000, e17, R. G. Sonowsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1119–1123; 1994 P. N. Gilles et al., Nature Biotechnol. 17, 365–370, 1999 beschrieben, wobei auch die Herstellung selbst mittels elektronischer
- 55 Adressierung durchgeführt werden kann.
- [0012] Die zu untersuchende Ausgangs-DNA kann z. B. ein, aus dem Zellkern isoliertes, Gen oder Genfragment sein, dessen Nucleotidsequenz bekannt ist. Die Ausgangs-DNA kann zur besseren Handhabung weiter fragmentiert werden. Die Fragmentierung kann unspezifisch z. B. durch Scherkräfte oder spezifisch z. B. durch einen Restriktionsverdau erfolgen. Die so erhaltenen DNA-Fragmente können anschließend für die chemische Umwandlung denaturiert werden.
- 60 [0013] Die chemische Umwandlung von nicht methyliertem Cytosin in den Ausgangs-DNA-Sequenzen erfolgt dabei bevorzugt durch Verwendung von Bisulfiten, wobei Methylcytosin bei der Reaktion nicht umgesetzt wird. Die so behandelte DNA-Sequenz kann nun mit einer Detektor-DNA-Sequenz hybridisiert werden, wobei die Detektor-DNA-Sequenz komplementär zu der chemisch unbehandelten Ausgangssequenz sein kann. Bei der Hybridisierung der chemisch behandelten DNA-Sequenz mit der Detektor-DNA-Sequenz ergeben sich folglich Guanin/Uracil-Fehlpaarungen an den Sequenz-Positionen, an denen in der Ausgangssequenz ein nicht methyliertes Cytosin vorhanden war.
- 65 [0014] In einer bevorzugten Ausführungsform werden allerdings Detektor-DNA-Sequenzen verwendet deren Sequenz komplementär zu der chemisch unbehandelten Ausgangssequenz ist, wobei die Guaninbasen durch Adeninbasen ersetzt sind. Bei der Hybridisierung der Detektor-DNA-Sequenz mit der chemisch behandelten DNA-Sequenz werden somit

Adenin/Methylcytosin-Fehlpaarungen erhalten. Diese Verfahrensvariante eignet sich insbesondere zur Bestimmung des Methylierungsmusters von gering methylierten DNA-Sequenzen, wie sie zumeist bei Säugern oder Pflanzen vorkommen. Sauger DNA weist eine Methylierungsrate von 3 bis 10% auf, die von Pflanzen bis zu 50%. Viren weisen demgegenüber einen Methylierungsgrad von bis zu 100% auf, hier kann auch der direkte Nachweis der nicht methyliert vorliegenden Cytosine über die entsprechenden Guanin/Uracil-Fehlpaarungen vorteilhaft sein.

[0015] Auch die parallele Durchführung beider Verfahrensvarianten ist möglich.

[0016] Als Detektor-DNA-Sequenzen können z. B. synthetisch zugängliche Polynucleotide, bevorzugt mit einer Länge zwischen 5 und 100, besonders bevorzugt zwischen 12 und 35 Nucleotiden, verwendet werden. Die Detektor-DNA-Sequenzen lassen sich dazu aus der bekannten Ausgangs-DNA-Sequenz direkt ableiten. Die einzelnen Detektor-DNA-Sequenzen können sich dabei überlappen, so dass letztlich immer eine auftretende Fehlpaarung einem bestimmten Ort innerhalb der Ausgangs-DNA-Sequenz zugeordnet werden kann.

[0017] Die Fehlpaarungen können schließlich mit Fehlpaarung erkennenden Substanzen, wie z. B. mutS nachgewiesen werden.

[0018] Die chemische Umwandlung nicht methylierter Cytosinbasen in DNA-Sequenzen erfolgt bevorzugt an Einzelsträngen, die z. B. durch Denaturierung von doppelsträngigen DNA-Proben im alkalischen gewonnen werden können. Die umgewandelte DNA kann dann, falls nötig, weiter aufgearbeitet, dass heißt abgetrennt, erneut denaturiert, neutralisiert, präzipitiert und entsalzt werden.

[0019] Verfahren zur chemischen Umwandlung von Cytosin in Uracil sind z. B. beschrieben in "Bisulfite methylation analysis of single DNA-Strand", Tech. Tips Online 1998 BioMednet, Kimberly D Tremblay, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104 USA und in "Promoter methylation analysis on microdissected paraffin-embedded tissues using bisulfite treatment and PCR-SSCP", Biotechniques 30: 66-72 (January 2001) S. 66-72. Dabei wird die umzuwandelnde methylierte Cytosinbasen enthaltende DNA in Wasser gelöst und anschließend durch Zugabe einer Natriumbisulfit-Hydroquinon-Lösung im alkalischen unter erhöhter Temperatur unter Lichtausschluss umgesetzt. Nach Abschluss der Umsetzung kann die erhaltene DNA chromatographisch gereinigt werden.

[0020] Die Hybridisierung der chemisch umgewandelten DNA-Nucleotide mit der Detektor-DNA kann an jeder Oberfläche stattfinden, an die die Hybride ortsaufgelöst gebunden werden können. Dazu stehen bekannte Möglichkeiten, wie z. B. die Anbindung von Nucleinsäuren über Disulfidbrücken an Goldoberflächen oder die Bindung von biotinylierten Nucleinsäuren an mit Avidin belegte Oberflächen zur Verfügung. Die Hybridisierung selbst kann passiv oder aktiv elektronisch beschleunigt erfolgen, wie dies z. B. mit einem Chip der Firma Nanogen Inc. (San Diego/USA) möglich ist. Die elektronische Adressierung erfolgt dabei durch Anlegen eines elektrischen Feldes, bevorzugt zwischen 1,5 V und 2,5 V bei einer Adressierungsdauer zwischen 1 bis 3 Minuten. Aufgrund der elektrischen Ladung der zu adressierenden Nucleotidsequenzen wird deren Wanderung durch Anlegen eines elektrischen Feldes stark beschleunigt. Die Adressierung kann dabei ortsaufgelöst erfolgen, wobei an unterschiedlichen Zonen der Chipoberfläche nacheinander adressiert wird. Dabei können an den einzelnen Orten unterschiedliche Adressierungs- und Hybridisierungsbedingungen eingestellt werden.

[0021] Nach erfolgter Hybridisierung können sowohl die Guanin/Uracil- als auch die Adenin/Methylcytosin-Fehlpaarungen mit Fehlpaarungen erkennenden Substraten nachgewiesen werden. Geeignete Substrate sind z. B. Basenfehlpaarungen bindende Proteine wie mutS oder mutY, bevorzugt aus E.coli, T.thermophilus oder T.aquaticus, MSH 1 bis 6, bevorzugt aus S. cerevisiae, 51-Nuclease, T4-Endonuclease, Thyminglykosylase, Cleavase oder Fusionsproteine enthaltend eine Domäne dieser Basenfehlpaarungen-bindenden Proteine.

[0022] Das Fehlpaarungen erkennende Protein kann außer farbstofftragenden, lumineszierenden und fluoreszierenden Gruppen auch polymere Marker (J. Biotechnol. 35, 165-189, 1994), Metallmarker, enzymatische oder radioaktive Markierungen oder Quantum dots (Science Vol 281, 2016, 25. Sep. 1998) enthalten. Die Enzymmarkierung kann dabei z. B. eine direkte Enzymkupplung oder ein Enzymsubstrattransfer oder eine Enzym-Komplementation sein. Zur enzymatischen Markierung eignen sich vor allem die Chloramphenicol-Acetyltransferase, die alkalische Phosphatase, die Luciferase oder die Peroxydase.

[0023] Insbesondere die Substratmarkierung mit Farbstoffen, die im Bereich zwischen 400 und 800 nm Licht absorbieren oder emittieren ist bevorzugt. Unter den zur Markierung geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen sind vor allem CyTM3, CyTM5 (von Amersham Pharmacia), Oregon Green 488, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647, Bodipy 558/568, Bodipy 650/665, Bodipy 564/570 (z. B. von der Firma Molecular Probes, Deutschland), S 0535, S 0536 (z. B. von der Firma Invitrogen, Deutschland), Dy-630-NHS, Dy-635-NHS, EVOblue30-NHS (z. B. von der Firma Invitrogen, Deutschland), FAR-Blue, FAR-Fuchsia (z. B. von der Firma Molecular Probes, Schweiz), Atto 650 (von der Firma Atto Tech, Deutschland), FITC oder Texas Red zu bevorzugen. Neben den direkt markierten Substraten können auch markierte Antikörper verwendet werden, die direkt gegen mutS oder gegen eine fusionierte Peptidomäne, wie z. B. MBP, gerichtet sind.

[0024] Da jedem Ort der Trägeroberfläche eine definierte Nucleotidsequenz zugeordnet werden kann, kann aus den erhaltenen Fluoreszenzsignalen, in den Fällen in denen an jedem Ort auf dem Träger genau eine mögliche Fehlpaarung auftreten kann, direkt in das entsprechende Methylierungsmuster übersetzt werden. In der Regel sind aber an jedem Ort auf der Trägeroberfläche mehrere potentielle Fehlpaarungspositionen (Cytosine in der entsprechende Teilsequenz der Ausgangs-DNA) enthalten. Zur Ermittlung des Methylierungsmusters anhand der Fluoreszenzsignale ist es dann zweckmäßig sich in ihrer Sequenz überlappende Detektor-DNA-Sequenzen einzusetzen. Die Auswertung erfolgt dann nach der "Clustering analysis"-Methode (beschrieben in Eisen, M. B., Spellman, P.T., Brown P. O., Botstein D 1998, Cluster analysis and display of genome wide expression pattern, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14863-14868; Review: Discovering Pattern in Microarray Data Molecular Diagnosis Vol. 5 No. 4 2000 Harry Burke. S349) oder der "Principal Components analysis"-Methode (beschrieben in Hilsenbeck SG, Friederichs WE, Schiff R., Statistical analysis of array expression data as applied to the problem of tamoxifen resistance J. Natl. Cancer Institut 1999 91 453-459).

[0025] Die Spezifität der Messung von Fehlpaarungen mit mutS, einem bevorzugten Fehlpaarungen erkennenden Substrat kann weiter durch die Zugabe von Tensiden oder durch Zugabe von BSA, dass unspezifische Bindungsstellen an

den Hybriden blockiert erhöht werden. MutS besitzt darüber hinaus den Vorteil, dass eine Messung auch unter Niedrigsalzbedingungen bis zu einer Salzkonzentration von 10 mM erfolgen kann.

[0026] Um die Zuverlässigkeit des Verfahrens weiter zu verbessern können durch einen Zwischenschritt etwaige, nach dem Hybridisierungsschritt auf dem Träger fixierte, einzelsträngige Nucleotidsequenzen durch Zugabe einer Nuclease, bevorzugt einer Mung Bean Nuclease oder S1-Nuclease, abgebaut werden.

[0027] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das Methylierungsmuster von DNA-Fragmenten mit bekannter Sequenzen einfach und schnell bestimmt werden. Insbesondere durch die Verwendung von aktiven, elektronisch adressierbaren Chips kann die Messdauer weiter gesenkt und die Zuverlässigkeit der Messung, durch die sehr gute elektrische Kontrollierbarkeit der Hybridisierung, verbessert werden. Die einmal mit Detektor-DNA belegten Träger sind darüber hinaus wiederverwendbar, die gemessene DNA kann einfach dehybridisiert und von der Oberfläche abgewaschen werden. Dies ermöglicht einen hohen Probendurchsatz mit einem belegten Träger.

[0028] Zur Erläuterung des beanspruchten Verfahrens sind die einzelnen Verfahrensschritte in Fig. 1 beispielhaft schematisch wiedergegeben. In Schritt I) ist die chemische Umsetzung von Ausgangs-DNA-Oligonucleotiden gezeigt. Die Oligonucleotide sind strichförmig dargestellt, wobei das linke Oligonucleotid ein Methylcytosin (^{5m}C), das rechte Oligo an der gleichen Stelle ein nicht methyliertes Cytosin (C) enthält. Bei der Umsetzung werden die nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt. Im Anschluss werden die Oligonucleotide auf eine Chipoberfläche aufgetragen, die Detektor-DNA mit einer Adeninbase an der zu den Positionen ^{5m}C und C komplementären Stelle auf dem Detektor-DNA-Oligonucleotid, enthält (Schritt II)). Schritt III) zeigt die Hybridisierung der aufgetragenen Oligonucleotide mit der Detektor-DNA-Sequenz, wobei im Falle des Vorhandenseins eines Methylcytosins an dieser Position eine Fehlpaarung entsteht, die mit fluoreszenzmarkierten mutS detektiert werden kann.

Ausführungsbeispiele

Nachweis von Methylierten C-Bausteinen in DNA auf einem aktiven elektrischen Chips und dem Enzym MutS

[0029] In einem ersten Versuch wird gezeigt, dass mit Hilfe des beanspruchten Verfahrens die Detektion von Adenin/Methylcytosin-Fehlpaarungen mit fluoreszenzmarkiertem mutS als Fehlpaarungen erkennendes Substrat gelingt. Wobei zur Hybridisierung.

[0030] Dazu wurden die Oligonucleotide Seq. ID No. 1, 2 und 3 (0.05 µMol Maßstab) mit Wasser verdünnt, so dass eine Endkonzentration 10 picomol/1 µl vorliegt. Die wässrige Lösung wurde anschließend in 50 mM Histidin Puffer 1 : 100 gelöst.

Eingesetzte Oligonucleotide

1) Detektor-DNA mit Biotin am 5'-Ende (sense + 2A (5'-biotinyliert))

AAACATA CAA AAATTA AAAT ACAAATCATC TCTAACCA (Seq. ID No. 1)

2) Modell-Verbindungen um MutS-Bindung zu evaluieren (5'-CY3 markiert)

TGGTTAGAGA TGATTTGTA^{5m}C TTTAATTTTT GTATGT (Seq. ID No. 2)

TGGTTAGAGA TGATTTGTAT TTTAATTTTT GTATGT (Seq. ID No. 3)

[0031] Die methylmodifizierten Basen sind als ^{5m}C gekennzeichnet.

[0032] Adressierung auf elektrisch adressierbaren Chip mit Hydrogel-Layer:

Das biotinylierte Oligo wurde mit 2 V für 60 s auf die Elektroden des Chips (Nanogen Inc.) an zwei getrennte Orte auf der Oberfläche des Chips adressiert und fixiert. Die Hybridisierung der komplementären DNA-Oligos erfolgte ortsauflöst bei 2 V für 120 s in Histidin Puffer. Der Chip wurde für 10 min mit Puffer A (20 mM Tris/HCL pH, 7.6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.01% Tween/20, 1% BSA) gewaschen.

[0033] 0.5 µg Alexa Fluor 647 (der Firma Mobitec, Deutschland), markiertes mutS wurden in 100 µl Puffer A aufgenommen. Der Chip wird mit dem gelösten mutS für 45 Minuten inkubiert. Nach 45 Minuten wird der Chip mit 10 ml Puffer A ohne BSA gespült und im Anschluss die Fluoreszenz mit einem Scanner bestimmt.

[0034] Das Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt. Die Fluoreszenz zweier unabhängig voneinander vorgenommenen Messungen lag an dem Ort an dem die Hybridisierung von Seq. ID No. 1 und 2 zu einer Adenin/Methylcytosin-Fehlpaarung führte (Balken 1 in Fig. 2) bei 60.3 (Spot 1) und 55.7 (Spot 2) die Fluoreszenz lag an den Orten an denen keine Fehlpaarung vorlag bei 47.9 (Spot 3) und 29.5 (Spot 4). In Fig. 2 sind die entsprechenden Mittelwerte der beiden Messungen abgebildet.

Chemische Modifikation von Cytosin-Bausteinen zu Uracil-Bausteinen

10 µg bzw. 5 µg bzw. 1 µg eines Oligonucleotides Seq. ID No. 4

TGGCTAGAGA TGATCCGCA^{5m}C TTTAACTTCC GTATGC (Seq. ID No. 4)

(Ausgangs-DNA-Oligo, das chemisch behandelt wurde (5'-CY3 markiert))

mit einem Methylcytosin-Baustein wurden in 100 µl Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl 3 N

DE 102 04 566 A 1

wässriger NaOH-Lösung. Die 110 µl Lösung wurde 30 min. auf 42°C erhitzt und im Anschluss in 1020 µl 40.5%iger Natriumbisulfit- (pH 5) und 60 µl 10 mM Hydroquinon-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von weiteren 10 µl Wasser wurde das Gemisch für 16–18 Stunden bei 55°C unter Lichtausschluss erhitzt. Anschließend wurden 500 µl der entsprechenden Lösung auf einer NAPS-Säule (Pharmacia) pipettiert, die nach Herstellerangaben konditioniert wurde. Das entsprechende Oligonucleotid wurde mit 800 µl Wasser eluiert. Die Umsetzung wird durch Zusatz 3 M NaOH zu der erhaltenen Oligonucleotid-Fraktion bis zu einer NaOH-Endkonzentration von 0,3 M bei 37°C vervollständigt. Danach werden die erhaltenen chemisch umgewandelten DNA-Oligonucleotide nochmals durch Chromatographie an einer NAPS-Säule gereinigt und entsalzt. 50 µl der entsalzten Lösung wurden mit 50 µl 100 mM Histidin-Lösung verdünnt. Es werden DNA-Oligonucleotide erhalten deren nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt wurden.

[0035] Herstellung der 40.5%igen Natriumbisulfit-Lösung (Sigma. S-8890. 8.1 g/20 ml): Dazu wurde die Festsubstanz in 17 ml kalten Wasser gelöst und mit 10 N NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 5 eingestellt und anschließend auf 20 ml aufgefüllt. Als Hydroquinon-Lösung wurde eine 10 mM (Sigma H-9003) Lösung verwendet. (Die chemische Umwandlung von Cytosin in Uracil ist z. B. beschrieben in "Bisulfite methylation analysis of single DNA-Strand", Tech. Tips Online 1998 BioMednet; Kimberly D Tremblay, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104 USA und in "Promoter methylation analysis on microdissected paraffin-embedded tissues using bisulfite treatment and PCR-SSCP", Biotechniques 30: 66–72 (January 2001) S. 66–72)

Unspezifische Markierung von mutS mit Alexa Fluor 647

[0036] Für die Konjugation wird der entsprechende Alexa Fluor 647 Succinimidylester über eine nukleophile Substitutionsreaktion an Proteinlysinreste unspezifisch kovalent gemäß dem FluoroLink™ product specification protocol, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK geknüpft. Dabei erfolgt die Fluoreszenzmarkierung von mutS durch Inkubation mit einem großen Überschuss an Fluorophor unter stark basischen Bedingungen (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,3). Das erhaltene fluoreszenzmarkierte mutS wird gelpermeationschromatographisch gereinigt.

DE 102 04 566 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Nanogen Recognomics GmbH

5 <120> Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsmusters von
DNA

10 <130> 202nr01.de

<140>
<141>

15 <160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 38
<212> DNA
25 <213> Künstliche Sequenz

<220>
30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Detektor-DNA
5'-biotinyliert

<400> 1
35 aaacatacaa aaattaaaat acaaatacatc tctaacca 38

<210> 2
40 <211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Modell-Oligonucleotid, 3'-CY3 markiert

50 <400> 2
tggtagaga tgattgtac ttaattttt gtatgt 36

55 <210> 3
<211> 36
<212> DNA
60 <213> Künstliche Sequenz

<220>

65

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modell-Oligonucleotid, 3'-CY3 markiert	
<400> 3	5
tggtagaga tgatttgtat ttttaattttt gtatgt	36
<210> 4	10
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	15
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Ausgangs-DNA-Oligonucleotid	20
<400> 4	
tggtagaga tgatccgcac ttttaacttcc gtatgc	36
	25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsmuster von DNA umfassend folgende Verfahrensschritte:
 - a) Chemische Umwandlung der Ausgangs-DNA mit bekannter Sequenz, wobei darin enthaltenes nicht methyliertes Cytosin in Uracil umgesetzt wird,
 - b) Hybridisierung von einzelsträngigen, nach Schritt a) behandelter DNA mit einzelsträngigen Detektor-DNA-Sequenzen die komplementär zur Ausgangs-DNA-Sequenz oder deren Teilsequenzen sind, wobei die Guaninbasen gegen Adenin ausgetauscht sein können,
 - c) Fixierung von einzelsträngigen Detektor-DNA-Sequenzen oder von einzelsträngigen nach Schritt a) behandelten DNA-Sequenzen vor oder während der Hybridisierung oder von Heteroduplices aus Detektor- und nach Schritt a) behandelten DNA-Sequenzen nach oder während der Hybridisierung, wobei die Fixierung ortsauflöst auf einem Träger erfolgt, so dass jeder Detektor-DNA-Sequenz ein bestimmter Ort zuzuordnen ist,
 - d) Inkubation mit einem Guanin/Uracil- oder Adenin/Methylcytosin-Fehlpaarungen erkennenden Substrat und Detektion der Substratbindungen.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridisierung elektronisch beschleunigt erfolgt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Fixierung von einzelsträngigen Detektor-DNA-Sequenzen oder einzelsträngigen nach Schritt a) behandelten DNA-Sequenzen vor oder während der Hybridisierung oder von Heteroduplices aus Detektor- und nach Schritt a) behandelten DNA-Sequenzen nach oder während der Hybridisierung ortsauflöst auf einer elektronisch adressierbaren Oberfläche erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Umwandlung des nicht methylierten Cytosins mit einem Bisulfit erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass die auf dem Träger fixierten einzelsträngigen Nucleotidsequenzen, die nicht hybridisiert vorliegen, durch Zugabe einer Nuclease abgebaut werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor-DNA DNA-Sequenzen mit einer Länge von 5 bis 100 Nucleotiden verwendet werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor-DNA überlappende DNA-Sequenzen verwendet werden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen 55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1

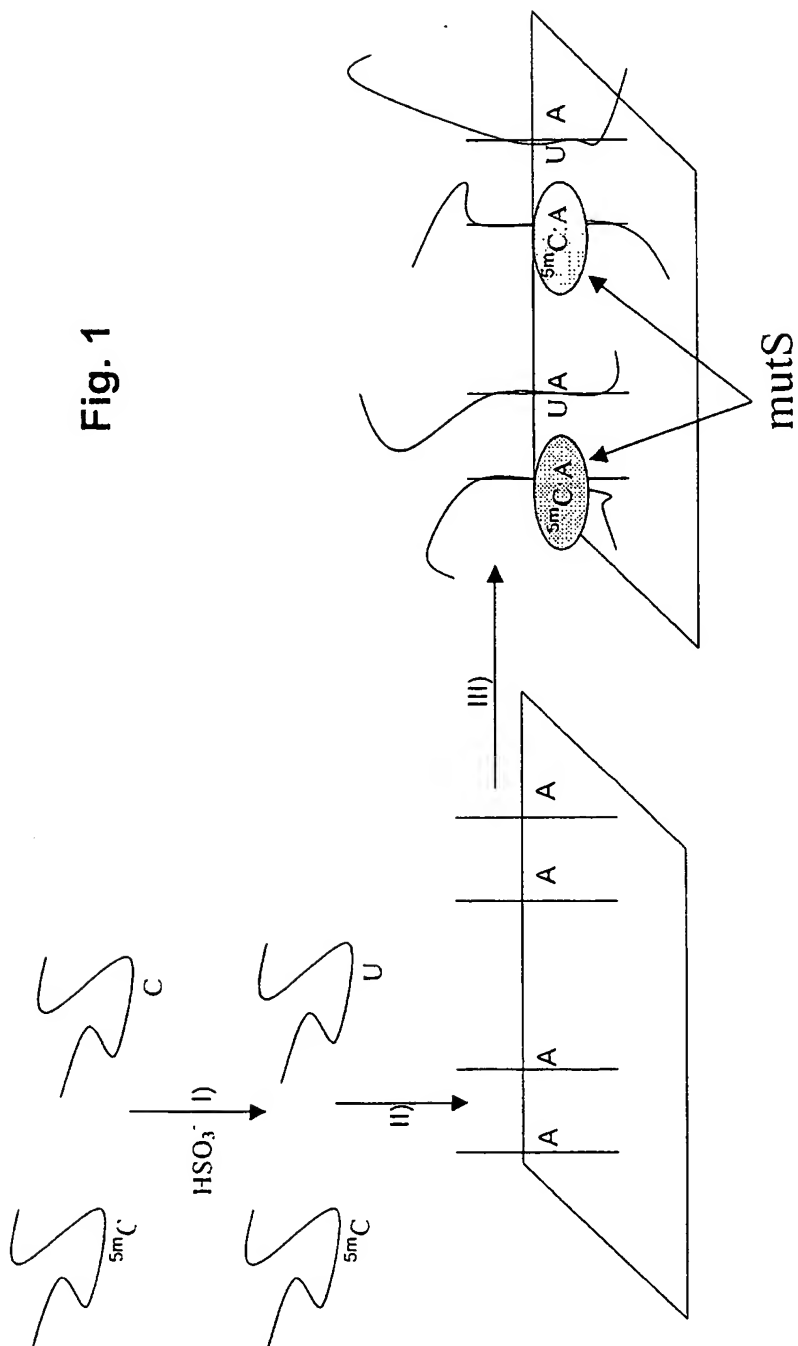
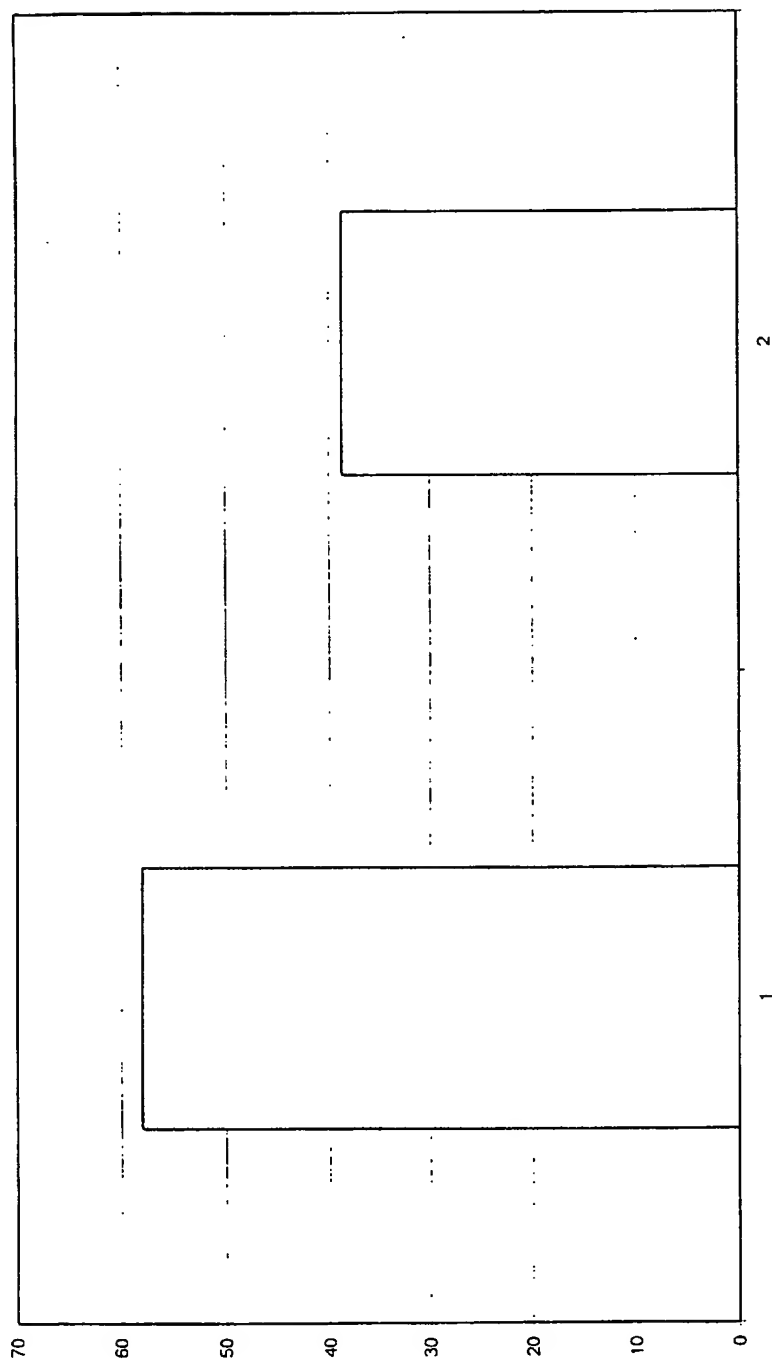


Fig. 2



BEST AVAILABLE COPY